

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP 99/5467

4

09/762045	
REC'D 26 NOV 1999	
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"DNA-Sequenz codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und deren Überproduktion in Pflanzen"

am 5. August 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 N, C 07 H und A 01 H der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 16. September 1999
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Ebert

Aktenzeichen: 198 35 219.0

M 23.10.98

Patentansprüche

1. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
5
2. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
10
3. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhte Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz in Pflanzen exprimiert wird.
15
4. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und eine DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
20
5. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes Agrobacterium tumefaciens, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.
25
6. Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4.
30
7. Pflanze nach Anspruch 6, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.
35
8. Verwendung der SEQ ID No. 1 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.
40



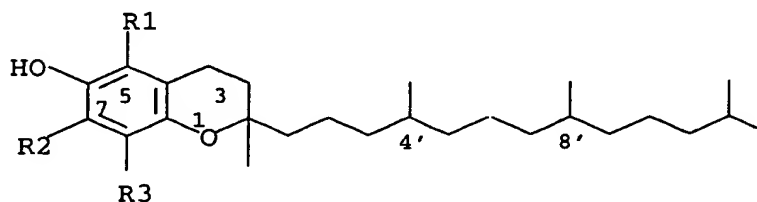
DNA-Sequenz codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und deren Überproduktion in Pflanzen

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, speziell die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz, einem Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, die derart hergestellte Pflanze selbst, sowie die Verwendung der SEQ ID No. 1 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a-d):



1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

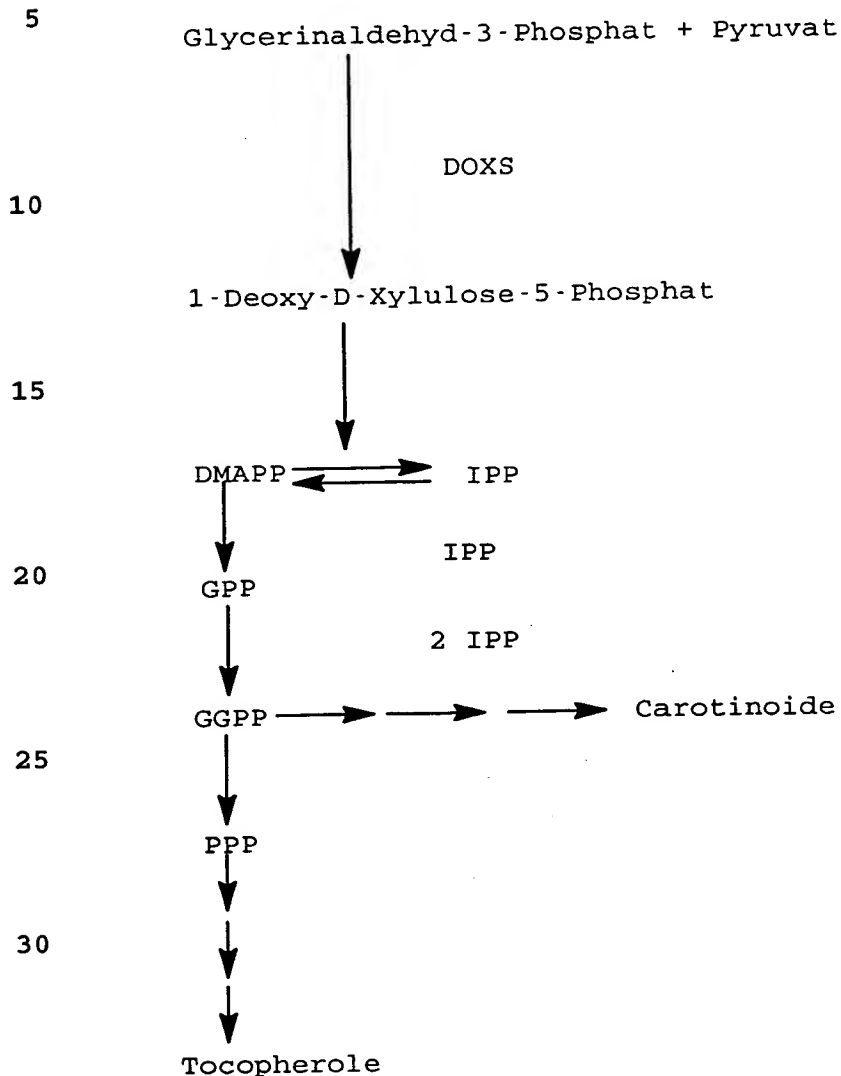
1b, β -Tocopherol [148-03-8]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$

1c, γ -Tocopherol [54-28-4]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

1d, δ -Tocopherol [119-13-1]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

11.23.10.99
3

vivo Fütterungsexperimente mit C^{13} gezeigt, daß in verschiedenen Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschritten wird:



Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat umgewandelt (Schwender et al., FEBS Lett. 414(1), 129-134(1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94(2), 10600-10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95(5), 2100-2104(1998); Lichtenthaler et al., FEBS Lett. 400(3), 271-274(1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung in IPP umgesetzt (Arigoni et al., 1997). Biochemische Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin,

Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch
5 verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen,
10 Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden.

Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Sythase (DOXS)-Gens in den Pflanzen.

15

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in Pflanzen die Aktivität der DOXS
20 durch Überexpression des homologen Gens (Gen aus Organismus der selben Art) erhöht. Dies kann auch durch die Expression eines heterologen Gens (Gens aus entfernten Organismen) erreicht werden. Nukleotidsequenzen sind aus Arabidopsis thaliana DOXS (Acc. No. U 27099), Reis (Acc. No. AF024512) und Pfefferminze
25 (Acc. No. AF019383) beschrieben.

In einem Ausführungsbeispiel wird das DOXS-Gen aus Arabidopsis thaliana (Seq-ID No.:1; Mandel et al, Plant J. 9, 649-658(1996); Acc. No. U27099) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert.

30 Eine Plastidenlokalisierung ist durch die in der Gensequenz enthaltenen Transitsignalsequenz gewährleistet. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DOXS-Gen codiert, das mit Seq-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. vorzugsweise aus anderen Pflanzen stammt.

35

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende GGPP wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide umgesetzt.

Die effiziente Bildung von Carotinoiden ist essentiell für die
40 Photosynthese, wobei sie neben den Chlorophyllen als "Lichtsamm-ler-Komplexe" zur besseren Ausnutzung der Photonenenergie dienen (Heldt, Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford, 1996). Zusätzlich erfüllen Carotinoide wichtige Schutzfunktionen gegen Sauerstoff-Radikale wie den
45 Singulett-Sauerstoff, den sie wieder in den Grundzustand zurück-führen können (Asada, 1994; Demming-Adams und Adams, Trends in Plant Sciences 1; 21-26(1996). Es wurde eine 1-Deoxy-D-Xylu-

M 23.10.99
7

Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, 5 in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987) 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den 10 Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 1 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- 15 - HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

20

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzen- 25 virus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des 30 eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195 - 2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS- 35 Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin- 40 induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

45 Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet.

DOXS-Gens in die Chloroplasten vom DOXS-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxydoreduktase) abgeleitet ist.

- Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DOXS kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DOXS-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.
- Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DOXS-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.
- Ferner können Manipulationen, die passende Restriktions-schnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffül-

M 23.10.99
11

Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

5

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Produktion eingesetzt werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128 - 143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205 - 225) beschrieben.



durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, 5 bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches DOXS-Polypeptid 10 oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf DOXS-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um 15 eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das DOXS-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte sowie Fusionsproteine aus einem 20 Transitpeptid und einem Polypeptid mit DOXS-Aktivität.

Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung 25 dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DOXS-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

30 Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DOXS-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in 35 fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DOXS-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

40

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DOXS-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DOXS-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol- 45 Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

M 23.10.99
15

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- Verwendung einer Pflanze zur Herstellung pflanzlicher DOXS.
- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA Sequenz.
- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS DNA-Sequenz in Pflanzen.
- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA Sequenz zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (E. coli, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kann) wurde von Deblaere et



pBIN19-Vektor in Antisense-Orientierung kloniert. Die Transformationen von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit den oben beschriebenen Konstrukten erfolgten mit *Agrobacterium tumefaciens* mit der Vakuum-Infiltrationsmethode (Bent et al., Science 265 (1994), 1856-1860). Mehrere unabhängige Transformanten wurden pro Konstrukt isoliert. Jeder Buchstabe (siehe Tabelle 1) bedeutet eine unabhängige transformierte Linie. Aus der daraus erhaltenen T1-Generation wurden Pflanzen auf Homo-oder Heterozygotie untersucht. Mehrere Pflanzen jeder Linie wurden gekreuzt, um eine Segregationsanalyse durchzuführen. Die Nummer in der Tabelle 1 entspricht der individuellen Pflanze, welche für weitere Analysen ausgewählt wurde. Es wurden sowohl homo- als auch heterozygote Linien erhalten. Die Segregationsanalyse der erhaltenen Linien ist in der folgenden Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1. Segregationsanalyse der transgenen DOXS-T2-Pflanzen

LINIEN	SEGREGATION
A9	75%
A19	100%
B11	75%
B4	100%
C2	100%
D3	75%
D17	100%
E9	75%
E14	100%
F9	75%
F14	100%

Beispiel 2

Nachweis erhöhter DOXS-RNA-Mengen in transgenen Pflanzen

Gesamt RNA aus 15 Tage alten Keimlingen verschiedener transgener Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, wurde nach der Methode von Logeman et al., Anal.Biochem. 163, 16-20 (1987) extrahiert, in einem 1.2% Agarosegel aufgetrennt, auf Filter transferiert und mit einem 2.1 kb langen DOXS-Fragment als Sonde hybridisiert (Abbildung 4).

M 23.10.99
19

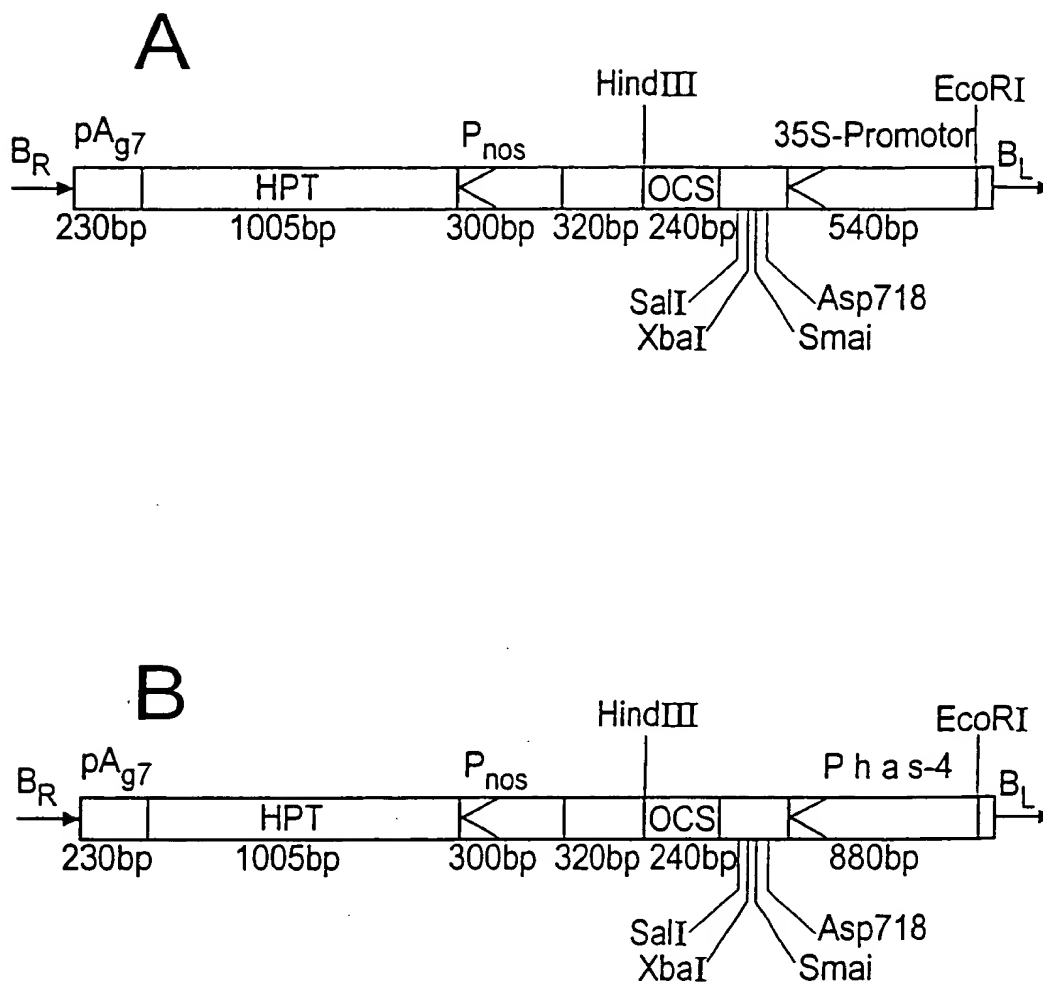
formationen erfolgten mit dem Agrobacterium Stamm LBA4404 (Clon-
tech). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen
pBIN19-Konstrukte mit der gesamten DOXS-cDNA verwendet. In diesen
pBIN-Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch die OCR-Ter-
minatorsequenz ersetzt. Brassica napus Samen wurden mit 70 %
(v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min in 55°C H₂O
gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25 % v/v Teepol, 0,1 %
v/v Twenn 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H₂O
für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Fil-
terpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15
ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen
(ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die
verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten.
Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basal-
medium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zu-
gabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für
24 h bei 100 U/min inkubiert.

Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in LB
mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml LB ohne
Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5
inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25
min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die
Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von
weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0.3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit ste-
rilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt,
vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-
Suspension wurde entfernt, die Raps-Explanten für 1 min mit 50 ml
Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-
Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h
auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-
Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums
gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und
zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min
gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Pe-
trischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten ent-
fernt. Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explanten in 90 mm
Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit
Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leuko-
por verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von
16/8 H inkubiert. Alle 12 Tage wurde die sich entwickelnden Kalli
auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt.
Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie
von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potry-

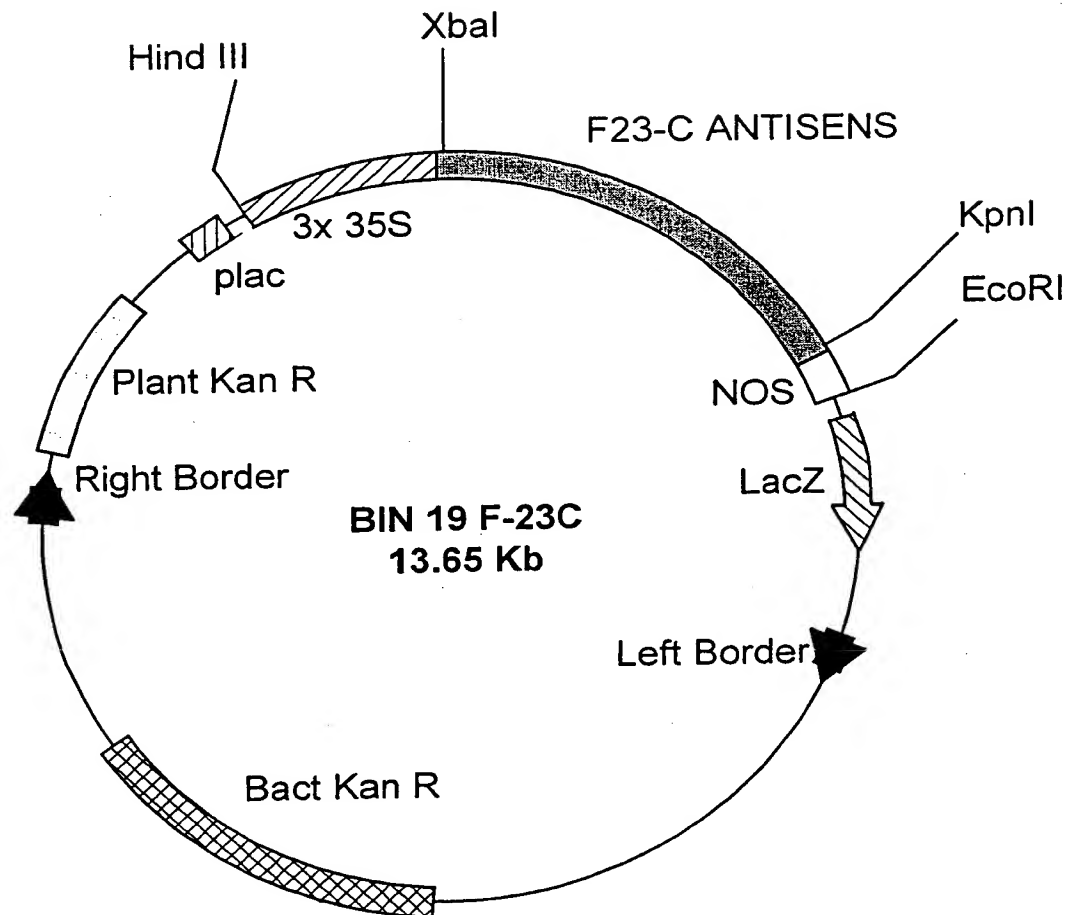
M 23 30 99

Abbildung 1



M 23 10 99

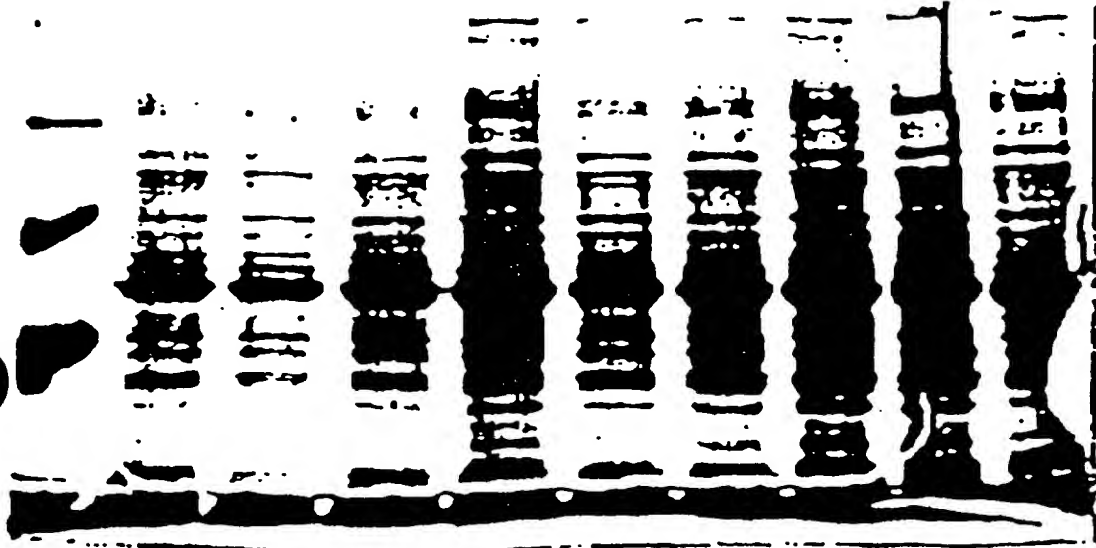
Abbildung 3



M 23. 10. 99

Abb. 5: Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

MW WT A19 B4 C2 D17 E14 F14 F7 D3



4.23.10.99

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANMELDER:
 - (A) NAME: BASF AG
 - (B) STRASSE: Carl-Bosch
 - (C) ORT: Ludwigshafen
 - (E) LAND: Germany
 - (F) POSTLEITZAHL: 67056
 - (G) TELEPHON: 0621-60-52698
- (ii) ANMELDETITEL: DOXS
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2
- (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:
 - (A) DATENTR GER: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) L NGE: 2458 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzel
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (B) STAMM: Arabidopsis thaliana
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 - (B) CLON: F-23-C
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 1..2154
- (x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:
 - (A) AUTORS: Mandel, MA
Feldmann, KA
Herrera-Estrella, L
Rocha-Sosa, M
Leon, P
 - (B) TITEL: CLA 1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution.
 - (C) ZEITSCHRIFT: Plant Journal
 - (D) BAND: 9
 - (F) SEITEN: 649-658
 - (G) DATUM: 1996
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG	GCT	TCT	TCT	GCA	TTT	GCT	TTT	CCT	TCT	TAC	ATA	ATA	ACC	AAA	GGA
Met	Ala	Ser	Ser	Ala	Phe	Ala	Phe	Pro	Ser	Tyr	Ile	Ile	Thr	Lys	Gly
1				5					10					15	

48

GGA	CTT	TCA	ACT	GAT	TCT	TGT	AAA	TCA	ACT	TCT	TTG	TCT	TCT	TCT	AGA
Gly	Leu	Ser	Thr	Asp	Ser	Cys	Lys	Ser	Thr	Ser	Leu	Ser	Ser	Ser	Arg

96

GTA	GAT	GTG	TAT	GCT	CGA	GGA	ATG	ATA	AGC	GGT	ACT	GGA	TCG	TCA	CTG	960
Val	Asp	Val	Tyr	Ala	Arg	Gly	Met	Ile	Ser	Gly	Thr	Gly	Ser	Ser	Leu	
305					310					315					320	
TTT	GAA	GAA	CTC	GGT	CTT	TAC	TAT	ATT	GGT	CCA	GTT	GAT	GGG	CAC	AAC	1008
Phe	Glu	Glu	Leu	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Pro	Val	Asp	Gly	His	Asn	
				325					330					335		
ATA	GAT	GAT	TTG	GTA	GCC	ATT	CTT	AAA	GAA	GTT	AAG	AGT	ACC	AGA	ACC	1056
Ile	Asp	Asp	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Glu	Val	Lys	Ser	Thr	Arg	Thr	
			340					345					350			
ACA	GGA	CCT	GTA	CTT	ATT	CAT	GTG	GTG	ACG	GAG	AAA	GGT	CGT	GGT	TAT	1104
Thr	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	His	Val	Val	Thr	Glu	Lys	Gly	Arg	Gly	Tyr	
		355					360					365				
CCT	TAC	GCG	GAG	AGA	GCT	GAT	GAC	AAA	TAC	CAT	GGT	GTT	GTG	AAA	TTT	1152
Pro	Tyr	Ala	Glu	Arg	Ala	Asp	Asp	Lys	Tyr	His	Gly	Val	Val	Lys	Phe	
	370					375					380					
GAT	CCA	GCA	ACG	GGT	AGA	CAG	TTC	AAA	ACT	ACT	AAT	GAG	ACT	CAA	TCT	1200
Asp	Pro	Ala	Thr	Gly	Arg	Gln	Phe	Lys	Thr	Thr	Asn	Glu	Thr	Gln	Ser	
5					390					395					400	
TAC	ACA	ACT	TAC	TTT	GCG	GAG	GCA	TTA	GTC	GCA	GAA	GCA	GAG	GTA	GAC	1248
Tyr	Thr	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Val	Asp	
				405					410					415		
AAA	GAT	GTG	GTT	GCG	ATT	CAT	GCA	GCC	ATG	GGA	GGT	GGA	ACC	GGG	TTA	1296
Lys	Asp	Val	Val	Ala	Ile	His	Ala	Ala	Met	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Leu	
			420					425					430			
AAT	CTC	TTT	CAA	CGT	CGC	TTC	CCA	ACA	AGA	TGT	TTC	GAT	GTA	GGA	ATA	1344
Asn	Leu	Phe	Gln	Arg	Arg	Phe	Pro	Thr	Arg	Cys	Phe	Asp	Val	Gly	Ile	
		435					440					445				
GCG	GAA	CAA	CAC	GCA	GTT	ACT	TTT	GCT	GCG	GGT	TTA	GCC	TGT	GAA	GGC	1392
Ala	Glu	Gln	His	Ala	Val	Thr	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Cys	Glu	Gly	
	450					455					460					
CTT	AAA	CCC	TTC	TGT	GCA	ATC	TAT	TCG	TCT	TTC	ATG	CAG	CGT	GCT	TAT	1440
Leu	Lys	Pro	Phe	Cys	Ala	Ile	Tyr	Ser	Ser	Phe	Met	Gln	Arg	Ala	Tyr	
465					470					475					480	
GAC	CAG	GTT	GTC	CAT	GAT	GTT	GAT	TTG	CAA	AAA	TTA	CCG	GTG	AGA	TTT	1488
Pro	Gln	Val	Val	His	Asp	Val	Asp	Leu	Gln	Lys	Leu	Pro	Val	Arg	Phe	
				485					490					495		
GCA	ATG	GAT	AGA	GCT	GGA	CTC	GTT	GGA	GCT	GAT	GGT	CCG	ACA	CAT	TGT	1536
Ala	Met	Asp	Arg	Ala	Gly	Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Pro	Thr	His	Cys	
			500					505					510			
GGA	GCT	TTC	GAT	GTG	ACA	TTT	ATG	GCT	TGT	CTT	CCT	AAC	ATG	ATA	GTG	1584
Gly	Ala	Phe	Asp	Val	Thr	Phe	Met	Ala	Cys	Leu	Pro	Asn	Met	Ile	Val	
		515					520					525				
ATG	GCT	CCA	TCA	GAT	GAA	GCA	GAT	CTC	TTT	AAC	ATG	GTT	GCA	ACT	GCT	1632
Met	Ala	Pro	Ser	Asp	Glu	Ala	Asp	Leu	Phe	Asn	Met	Val	Ala	Thr	Ala	
		530					535				540					
GTT	GCG	ATT	GAT	GAT	CGT	CCT	TCT	TGT	TTC	CGT	TAC	CCT	AGA	GGT	AAC	1680
Val	Ala	Ile	Asp	Asp	Arg	Pro	Ser	Cys	Phe	Arg	Tyr	Pro	Arg	Gly	Asn	
545					550					555					560	
GGT	ATT	GGA	GTT	GCA	TTA	CCT	CCC	GGA	AAC	AAA	GGT	GTT	CCA	ATT	GAG	1728
Gly	Ile	Gly	Val	Ala	Leu	Pro	Pro	Gly	Asn	Lys	Gly	Val	Pro	Ile	Glu	
				565					570					575		

M 23.10.99
Doxs.app

Gly 65	Glu	Tyr	Tyr	Ser	Asn 70	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro 75	Leu	Leu	Asp	Thr	Ile 80
Asn	Tyr	Pro	Ile	His 85	Met	Lys	Asn	Leu	Ser 90	Val	Lys	Glu	Leu	Lys 95	Gln
Leu	Ser	Asp	Glu 100	Leu	Arg	Ser	Asp	Val 105	Ile	Phe	Asn	Val	Ser 110	Lys	Thr
Gly	Gly	His 115	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Gly 120	Val	Val	Glu	Leu	Thr 125	Val	Ala
Leu	His 130	Tyr	Ile	Phe	Asn	Thr 135	Pro	Gln	Asp	Lys	Ile 140	Leu	Trp	Asp	Val
Gly 145	His	Gln	Ser	Tyr	Pro 150	His	Lys	Ile	Leu	Thr 155	Gly	Arg	Arg	Gly	Lys 160
Met	Pro	Thr	Met	Arg 165	Gln	Thr	Asn	Gly	Leu 170	Ser	Gly	Phe	Thr	Lys 175	Arg
Gly	Glu	Ser	Glu 180	His	Asp	Cys	Phe	Gly 185	Thr	Gly	His	Ser	Ser 190	Thr	Thr
Ile	Ser	Ala 195	Gly	Leu	Gly	Met	Ala 200	Val	Gly	Arg	Asp	Leu 205	Lys	Gly	Lys
Asn 210	Asn	Asn	Val	Val	Ala	Val 215	Ile	Gly	Asp	Gly	Ala 220	Met	Thr	Ala	Gly
Gln 225	Ala	Tyr	Glu	Ala	Met 230	Asn	Asn	Ala	Gly	Tyr 235	Leu	Asp	Ser	Asp	Met 240
Ile	Val	Ile	Leu	Asn 245	Asp	Asn	Lys	Gln	Val 250	Ser	Leu	Pro	Thr	Ala 255	Thr
Leu	Asp	Gly	Pro 260	Ser	Pro	Pro	Val	Gly 265	Ala	Leu	Ser	Ser	Ala 270	Leu	Ser
Arg	Leu	Gln 275	Ser	Asn	Pro	Ala	Leu 280	Arg	Glu	Leu	Arg	Glu 285	Val	Ala	Lys
Gly 290	Met	Thr	Lys	Gln	Ile	Gly 295	Gly	Pro	Met	His	Gln 300	Leu	Ala	Ala	Lys
Ile	Asp	Val	Tyr	Ala	Arg 310	Gly	Met	Ile	Ser	Gly 315	Thr	Gly	Ser	Ser	Leu 320
Phe	Glu	Glu	Leu	Gly 325	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Gly 330	Pro	Val	Asp	Gly	His 335	Asn
Ile	Asp	Asp	Leu 340	Val	Ala	Ile	Leu	Lys 345	Glu	Val	Lys	Ser	Thr 350	Arg	Thr
Thr	Gly	Pro 355	Val	Leu	Ile	His	Val 360	Val	Thr	Glu	Lys	Gly 365	Arg	Gly	Tyr
Pro	Tyr	Ala 370	Glu	Arg	Ala	Asp 375	Asp	Lys	Tyr	His	Gly 380	Val	Val	Lys	Phe
Asp 385	Pro	Ala	Thr	Gly	Arg 390	Gln	Phe	Lys	Thr	Thr 395	Asn	Glu	Thr	Gln	Ser 400
Tyr	Thr	Thr	Tyr	Phe 405	Ala	Glu	Ala	Leu	Val 410	Ala	Glu	Ala	Glu	Val 415	Asp
Lys	Asp	Val	Val	Ala	Ile	His	Ala	Ala 425	Met	Gly	Gly	Gly	Thr 430	Gly	Leu

M 23. 10. 99

DNA-Sequenz codierend für ein 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat
Synthase-Gen und dessen Überproduktion in Pflanzen

5

Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E
Biosyntheseleistung durch Überexpression eines pflanzlichen
1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase-Gens aus Arabidopsis.

15

20

25

30

35

40

45

THIS PAGE BLANK (USPTO)